

Evaluación del efecto de la Chitosana en la fase de enraizamiento *in vitro* de papa var. 'Desirée' y en la producción de minitubérculos en casa de cultivo

Felipe Jiménez-Terry*, Britta Kowalski, Daniel Agramonte, Marta Pérez, Raúl Collado, Raúl Barbón, Mariana La O. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e. mail: felipe@ibp.co.cu

RESUMEN

La plantación en casas de cultivo de plantas de papa obtenidas por cultivo *in vitro* ha presentado como principal problema la poca uniformidad de crecimiento de las poblaciones, el bajo e inestable rendimiento y la baja calidad de los minitubérculos producidos. La Chitosana es un elicitor que ha sido utilizado en campo para incrementar el rendimiento de plantaciones de papa. En el presente trabajo se evalúa la aplicación de diferentes concentraciones de este elicitor en la fase de enraizamiento *in vitro* y el efecto posterior en la producción de minitubérculos en la casa de cultivo. Se añadió chitosana en el medio de cultivo semisólido en las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100 g.l⁻¹ y se evaluó la influencia en la producción de minitubérculos en la casa de cultivo. Se observó fitotoxicidad en las plantas cultivadas *in vitro* a las concentraciones de 1, 10 y 100 g.l⁻¹ de Chitosana, disminución de la altura y la masa fresca de las plantas. Sin embargo, se logró un efecto favorable sobre la altura de las plantas, el número de hojas y la masa fresca de las plantas al añadir 0.01g.l⁻¹ de chitosana al medio de cultivo. La aplicación de esta concentración mejoró la calidad del crecimiento de las plantas *in vitro* e influyó en el incremento del número y masa de los minitubérculos en la casa de cultivo.

Palabras clave: elicitor, fitotoxicidad, plantas *in vitro*

ABSTRACT

The plantation of potato *in vitro* plants in greenhouse present some problems. Mainly the low uniformity of growing populations, the low and irregular yield and the low quality of the minitubers. The Chitosan is an elicitor used in the farm for increasing the yield of the potatoes plantations. The application to different concentrations of this elicitor in the *in vitro* rooting stage and its effect in the production of the minitubers in greenhouse were evaluated in the present work. Chitosan was added in culture semisolid medium in concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10, 100 g.l⁻¹ and the influence in the production of minitubers in greenhouse was evaluated. The elicitor produced fitotoxicity on plants in concentrations of 1, 10 and 100 g.l⁻¹; the length and fresh weight of plants decreased. Nevertheless, the concentration of 0.01 g. l⁻¹ has a favorable effect on the size, number of leaves and fresh weight of the plants. Its application improved the quality of the plants and influenced on the increase of weight and number of minitubers per plants in the greenhouse.

Key words: elicitor, *in vitro* plants, phytotoxicity

INTRODUCCIÓN

En Cuba, se invierten anualmente alrededor de 10 millones de dólares en la compra de semilla de papa a Holanda y Canadá (Agramonte, 2000) con el riesgo de que se introduzcan agentes patógenos, insectos y otros microorganismos que existen inevitablemente en toda importación de grandes volúmenes de materiales de siembra (Pérez, 1998). Precisamente por estas razones, desde hace varios años, instituciones científicas y productivas nacionales, vienen desarrollando ingentes esfuerzos por implementar un programa integral de producción nacional de semilla de papa.

Este programa contempla la producción de semilla en sus diferentes categorías con garantía en la calidad genética y fitosanitaria, lo cual le confiere un

peso fundamental a la fase de producción de semilla original (Pérez y Suárez, 1998).

La propagación de plantas *in vitro* a través de medios de cultivo estáticos es el método biotecnológico que generalmente se aplica. Mediante el mismo, se logran plantas enraizadas *in vitro* que son utilizadas para producir minitubérculos semilla. El principal problema que ha presentado la producción de minitubérculos semilla en casa de cultivo a partir de plantas propagadas *in vitro*, ha sido la poca uniformidad de crecimiento de las poblaciones, necesidad de un mayor rigor en las atenciones culturales, el bajo e inestable rendimiento y la baja calidad de los tubérculos producidos (Jiménez *et al.*, 2005).

Existen diversos compuestos que mejoran la calidad de las plantas *in vitro* con un efecto positivo en el

rendimiento posterior en el campo. Dornenburg y Knorr (1994), Tumová y Backovská (1999) así como Yu *et al.* (2002); señalan que la quitosana es un elicitor, que aplicado en los medios de cultivo para la micropropagación puede incrementar el crecimiento, el vigor y la materia seca de las plantas *in vitro* y como consecuencia facilitar la aclimatización necesaria en condiciones *ex vitro*. La quitosana es un derivado de productos naturales que se obtiene de biomásas con alto nivel de Quitina y es particularmente abundante en el exoesqueleto de los crustáceos. Su componente activo fundamental es la quitina, biopolímero de alto peso molecular, que no es tóxico y es biodegradable.

Esta problemática en la producción de semilla de papa a partir de plantas propagadas *in vitro* y la búsqueda de soluciones justificaron el desarrollo de la siguiente investigación en la cual se evaluó el efecto de la quitosana sobre la calidad de plantas *in vitro* de papa variedad 'Desirée' en la fase de enraizamiento y su repercusión en el rendimiento en la casa de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de propagación masiva del Instituto de Biotecnología de Las Plantas perteneciente a la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, ubicada en Santa Clara.

Material vegetal

En los experimentos se emplearon plantas *in vitro* de papa de la variedad 'Desirée' (Urgenta x Depesche) que procedían de un cuarto subcultivo en la fase de multiplicación. Las mismas se subcultivaron a medio de cultivo de enraizamiento con diferentes concentraciones de quitosana y un control, las condiciones de cultivo se realizaron según la metodología descrita por Agramonte (2000); en la cual señala que un explante de papa (esqueje) está constituido por una porción de tallo que contiene una hoja y una yema axilar en la base de esta.

Elicitor: Chitosana (Chitoplant)

Chitosana (young chito) elaborado en la ciudad de Bremen, Alemania, 99% de pureza.

Efecto de Chitosana sobre el crecimiento de plantas *in vitro* de papa en fase de enraizamiento

Se utilizó el medio de cultivo compuesto por las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), tiamina 0.5 mg.l⁻¹, mio-inositol 100 mg.l⁻¹, sacarosa 30 g.l⁻¹, gelrite 2.5 g.l⁻¹ y pH 5.7; al cual se añadieron cinco

concentraciones de Chitosana (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 g.l⁻¹). El compuesto fue adicionado al medio de cultivo previo a la esterilización. Se utilizaron cuatro frascos de cultivo (250ml) y se colocaron diez explantes por cada uno, para un total de 40 por tratamiento. Los frascos fueron incubados en cámaras de crecimiento con luz artificial con fotoperiodo de 16 horas de luz, una intensidad luminosa de 42.0-48.0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y temperatura de 20 $\pm$ 2 °C.

Las variables evaluadas a los 21 días de cultivo en esta fase fueron:

- Longitud del tallo (cm)
- Número de entrenudos (u)
- Masa fresca (g)
- Masa seca de la planta (g)

Efecto de Chitosana sobre el crecimiento y la tuberización de plantas de papa en casa de cultivo con sustrato de zeolita

Se tomaron plantas *in vitro* provenientes de los diferentes tratamientos con Chitosana (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 g.l⁻¹). Estas fueron plantadas en una casa de cultivo con un sustrato compuesto únicamente por zeolita de granulometría 1-3 mm, la cual fue previamente cargada con la fórmula NEREA III (Jiménez, 2000). La distancia de plantación fue de 0.15 x 0.10 m. Se utilizó un diseño de bloques al azar con cuatro réplicas. Cada bloque estaba conformado por cinco surcos de 20 plantas cada uno. Para las evaluaciones se utilizaron 15 plantas de los tres surcos centrales, cinco por cada uno. Se emplearon los sistemas de riego por microaspersión y goteo, se suspendieron los mismos antes de la cosecha a los 75 días. Las atenciones culturales y el control fitosanitario se realizaron siguiendo las Normas Técnicas del cultivo según describe Agramonte (2000). Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- Longitud del tallo (cm) (45 días, 30 plantas por réplica).
- Número de entrenudos (45 días, 30 plantas por réplica).
- Número de minitubérculos por planta (cosecha a los 75 días, 60 plantas por réplica).
- Masa fresca de minitubérculos por plantas (g)(cosecha a los 75 días, 60 plantas por réplica).

El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS Versión 6.1.3 para Windows. Las variables fueron analizadas en forma independiente mediante diferentes modelos de análisis de varianza previa comprobación de los supuestos de normalidad y

homogeneidad de varianzas. Las variables con dificultades en estos supuestos fueron procesadas por la prueba no paramétrica de (Kruskal-Wallis).

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de Chitosana sobre el crecimiento de plantas *in vitro* de papa en fase de enraizamiento

Las concentraciones de 0.01 y 0.1 g.l⁻¹ de Chitosana en el medio de cultivo tuvieron un efecto positivo sobre las variables longitud del tallo, número de entrenudos, masa fresca y seca con valores superiores al grupo control. Para la masa fresca los mejores resultados se obtuvieron con la concentración de 0.1 g.l⁻¹. Las concentraciones de 10 y 100 g.l⁻¹ provocaron una disminución de la masa seca de las plantas en la fase de enraizamiento. De forma general, se observó que disminuyeron los valores de las diferentes variables con el incremento de la concentración de este elicitador (Tabla 1).

Según O'Herlihy *et al.* (2003) la Chitosana a una concentración de 17.5 mg.l⁻¹ en el medio de cultivo indujo un incremento en el desarrollo de los explantes en el cultivo *in vitro* de *Vitis vinifera* pero una concentración de 20 mg.l⁻¹ tuvo un efecto negativo en el mismo. Bittelli *et al.* (2001) comprobaron que con la adición de un hidrolizado de quitosana en el medio de cultivo, las bajas concentraciones del mismo tuvieron un efecto estimulador sobre el crecimiento de las plantas *in vitro* de *Citrus aurantium*. De otro modo, Dörnenburg *et al.* (1994) lograron la elicitación de quitinasas y un incremento de la longitud del tallo y materia seca en plantas *in vitro* de *Morinda* al aplicar Chitosana a bajas concentraciones (1 y 10 mg.l⁻¹).

Efecto de Chitosana sobre el crecimiento y la tuberización de plantas de papa en casa de cultivo con sustrato de zeolita

Se observaron diferencias entre los tratamientos con Chitosana. Con la concentración de 0.1 g.l⁻¹ se obtuvieron los mejores resultados con respecto a las variables evaluadas. Las concentraciones superiores a 0.1 g.l⁻¹ ocasionaron un efecto negativo sobre las variables longitud del tallo, el número de entrenudos y peso seco; los valores fueron inferiores al grupo control. Es de señalar que la Chitosana adicionada previamente al medio de cultivo en la fase de enraizamiento a la concentración de 0.1g.l⁻¹, provocó un incremento posterior en el peso fresco de las plantas de papa en la casa de cultivo (Tabla 2).

En el caso de las variables relacionadas con el rendimiento el tratamiento con 0.1 g.l⁻¹ fue significativamente superior a los restantes. Esta concentración fue la de mejores resultados con respecto al control, se obtuvieron 5.30 minitubérculos por planta y una masa promedio de 321.56 g de tubérculos por planta. En los tratamientos con concentraciones superiores de Chitosana hubo una disminución del número y masa de los tubérculos por planta (Tabla 3). Kowalski *et al.* (2005) describieron el incremento de la calidad morfológica y fisiológica de las plantas *in vitro* de papa en casa de cultivo y del rendimiento en condiciones de campo en plantaciones que recibieron aplicaciones foliares semanales de Chitosana (1 g.l⁻¹).

Estudios realizados por Kowalski *et al.* (1999), Agramonte (2000) Kowalski *et al.* (2003) demostraron que la calidad de las plantas *in vitro* influyó posteriormente en el desarrollo de las plantaciones en la fase de aclimatación y en el campo. Las condiciones fisiológicas favorables para la tuberización de la papa pueden ser establecidas en las fases *in vitro*, lo cual es completado entonces en la etapa posterior del proceso de producción de semilla (Cassells *et al.*, 1999).

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de Chitosana en la fase de enraizamiento *in vitro* de papa var. 'Desirée'

Chitosana (g.l ⁻¹)	Longitud del tallo (cm)	Número de Entrenudos (u)	Masa fresca (g)	Masa seca (g)
0.01	5.55 a	5.42 a	0.073 b	0.019 a
0.1	5.54 a	5.41 a	0.082 a	0.019 a
1	5.31 b	5.36 b	0.075 b	0.017 a
10	5.27 b	5.32 b	0.072 b	0.012 b
100	5.16 c	5.12 c	0.061 c	0.010 b
control	5.39 b	5.33 b	0.079 b	0.018 a

Medias con letras comunes en una misma columna no difieren significativamente según Duncan p<0.05%.

Tabla 2. Efecto de Chitosana Young Chito sobre el crecimiento de la plantas *in vitro* de papa var. 'Desirée' en casa de cultivo.

Chitosana (g.l ⁻¹)	Longitud del tallo (cm)	Número de Hojas (u)	Masa fresca /pta (g)	Masa seca (g)
0.01	28.04 a	15.8 c	33.78 c	18.55 b
0.1	28.09 a	17.6 a	36.46 a	19.62 a
1	26.23 c	15.4 c	33.49 c	18.01 b
10	26.11 c	14.9 d	31.72 c	17.23 c
100	23.39 d	12.6 e	29.84 d	15.48 d
Control	27.17 b	16.2 b	34.11 b	19.03 a
ES	0.21	0.39	0.46	0.11

Medias con letras comunes en una misma columna no defieren significativamente según Duncan $p < 0.05\%$.

Tabla 3. Efecto de la adición de Chitosana en la fase de enraizamiento de plantas *in vitro* de papa var. 'Desirée' sobre la tuberización en casa de cultivo.

Chitosana (g.l ⁻¹)	No. minitubérculos por planta (u)	Masa minitubérculos por planta (g)
0.01	3.50 b	238.73 c
0.1	5.30 a	321.56 a
1	3.20 c	244.16 c
10	2.90 d	222.39 d
100	2.70 d	206.45 e
Control	3.80 b	250.12 b
ES	0.47	22.6

Medias con letras comunes en una misma columna no defieren significativamente según Tuckey y Kruscal Wallis $p < 0.05\%$.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que la chitosana puede ser incorporada en la fase de enraizamiento de la micropropagación de la papa var. 'Desirée', cuando se utiliza a una concentración de 0.1 g.l⁻¹. Su aplicación al medio cultivo mejoró la calidad de las plantas *in vitro* en la fase de enraizamiento y como consecuencia incrementó la producción de minitubérculos por planta en la casa de cultivo.

REFERENCIAS

- Agramonte D (2000) Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis para aspirar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara
- Bittelli M, Flury M, Campbell G, Nichols E (2001) Reduction of transpiration through foliar application of Chitosan. Agric. For. Meteorol. 107: 167-175
- Cassells AC, Kowalski B, Fitzgerald DM, Murphy GA (1999) The use of image analysis to study developmental variation in micropropagated potatoes (*Solanum tuberosum* L.) Potato Research 4: 541-548
- Dörnenburg H, Knorr D (1994) Elicitation of chitinases and antraquinones in *Morinda citrifolia* cell cultures. Food Biotechnology 8: 57- 61
- Estévez A, González M, Castillo J, Ortíz U (1998) Selección de clones cubanos de papa (*Solanum tuberosum* L.) procedentes de familias híbridas obtenidas por el centro internacional de la papa. Cultivos Tropicales 19 (3): 39-43
- Jiménez F, Kowalski B, Agramonte D, Barbón R, Collado R, Pérez M, Gutiérrez O (2005) Uso de análogos de brasinoesteroides para la producción de minitubérculos de *Solanum tuberosum* L. en casa de cultivo. Seminario Internacional INCA, La Habana
- Kowalski, B, Jimenez F, Jomarrón I, Agramonte D, Coll F (2003) Efecto de tres análogos de brasinoesteroides sobre caracteres morfológicos y fisiológicos de vitroplantas de papa cv. 'Desirée' *in vitro* y en invernadero. Biotecnología vegetal 3 (2): 115-117
- Kowalski B, Jäger AK, Van Staden J (1999) The effect of a seaweed concentrate on the *in vitro* growth and acclimatization of potato plantlets. Potato Research 42: 131-139
- Kowalski B, Jimenez F, Jomarrón I, Agramonte D, Coll F (2005) Application of Chitosan *in vitro* and in the greenhouse to increase seed quality and yield of minitubers potatoes. Biotecnología vegetal 4 (1): 74-77

O'Herlihy E, Duffy E, Cassells A (2003) The effects of arbuscular mycorrhizal fungi and chitosan sprays on yield and late blight resistance in potato crops from microplants. *Folia Geobotanica* 38: 201-207

Pérez JN (1998) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 34 - 39. IBP. Santa Clara

Pérez J, Suárez M (1998) Propuesta de ficha de costo para la producción de semilla original de papa por métodos

biotecnológicos. Informe técnico. IBP-UCLV. Santa Clara, Cuba

Tumová L, Backovská M (1999) Chitosan and the flavonoid production. *Herba Polonica* 45: 114-115

Yu LJ, Lan WZ, Qin WM, Jin WW, Xu HB (2002) Oxidative stress and taxol production induced by fungal elicitor in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biologia Plantarum* 45 (3): 459-461